

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. W. Straub

**Methodisch vergleichende Untersuchungen über die
Verteilung von Glutathion und anderen Metaboliten des
Hexosemonophosphat-Shunts am Corneaepithel des Rindes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
HANS RAINER BEERMANN
aus Bielefeld

1975
—

Marburg 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. W. Straub

**Methodisch vergleichende Untersuchungen über die
Verteilung von Glutathion und anderen Metaboliten des
Hexosemonophosphat-Shunts am Corneaepithel des Rindes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
HANS RAINER BEERMANN
aus Bielefeld

Marburg 1974



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 24.1.1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med Reim

Correferent: Prof Dr. med. Straub

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	Seite
	Anatomie	1
	Biochemie	3
II	Fragestellung	7
III	Methodischer Teil	
	1 Methode der warmen Abrasio	9
	2 Methode Frierstop	9
	3 Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe	
	a) saure Extraktion	10
	b) alkalische Extraktion	11
	4 pH Abhängigkeit des GSH/GSSG Systems	12
	5 Metabolitbestimmung	13
	6 Testvorschriften	15
	7 Berechnung der Einzelwerte	19
	8 Statistische Auswertung	19
IV	Ergebnisse	
	1 Warme Abrasio Tabelle	20
	2 Frierstop Tabelle	21
	3 Einordnung der Werte	22
	4 Veränderung der Metabolitspiegel durch warme Abrasio	24
V	Diskussion	
	1 Literaturvergleich	25
	2 ATP/ADP System	26
	3 GSH/GSSG System	27
	4 NADP/NADPH System	28
VI	Zusammenfassung	29

Einleitung

Die Hornhaut des Auges erfüllt im wesentlichen zwei Funktionen. Einerseits leistet sie als durchsichtige Membran und äußerste Begrenzung zum Außenmedium den entscheidenden Teil zur Brechung des Lichtes im optischen System des Auges; zum anderen entsteht eine besondere mechanische Belastung, denn sowohl Einwirkungen von außen als auch zum Teil pathologisch hohe Drücke von innen müssen ohne Funktionsverlust ertragen werden. Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit Aufbau, Pathologie und Stoffwechsel der Hornhaut, wobei besonders Stoffwechselprobleme weiten Raum für interessante Untersuchungen geben.

Die anatomischen Strukturen der Hornhaut werden sowohl den mechanischen als auch den optischen Anforderungen histologisch gerecht.

Die klassische Einteilung gliedert sie in fünf Schichten. Diese sind von außen nach innen aufgezählt: das Epithel, die BOWMAN'sche Membran (Lamina limitans anterior), das Stroma (substantia propria parenchyma), die Descemet'sche Membran (Lamina limitans posterior) und das Endothel. Das Epithel der Hornhaut macht 10 % ihrer Stärke aus und wird von mehreren Zellschichten gebildet. Beim Menschen sind es 5 - 8 (TENG), beim Rind ungefähr 10 Schichten. Der Aufbau ist bei allen Säugetieren gleich; er ist nach ROHEN mit den anderen Plattenepithelien des menschlichen Körpers zu vergleichen. Zylindrische Zellen sitzen einer Basalmembran auf und zeigen elektronenmikroskopisch das Bild großer intrazellulärer Aktivität.

Innerhalb von 3,5 - 7 Tagen wandern diese Zellen an die Oberfläche und werden abgestoßen. Die mittlere Zellage zeigt kubische Zellen, die durch cytoplasmatische Vorstülpungen in der Lage sind, die Tränenflüssigkeit festzuhalten (AONO, PEDLER); auf diese Weise erhält die wichtigste optische Fläche des Auges einen glatten Überzug.

Das Stroma besteht aus 5 - 10u dicken Fibrinlamellen (SALZMANN), die parallel gelagert sind (VIRCHOW) und bei höheren Wirbeltieren ungeordneter zu liegen scheinen als bei niedrigen. Ungefähr 200 dieser Lamellen liegen übereinander und machen ca. 90 % der Wirbeltierhornhaut aus. Zwischen diesen Lamellen liegen undifferenzierte Stromazellen, die mit Fibrocyten große Ähnlichkeit haben, und flache, polymorphkernige Leukocyten, die das Stroma durchwandern (VIRCHOW, ROHEN). Zwischen den Fibrillen liegen die für den Quellungszustand so wichtigen Mucopolysaccharide oder Glycosaminoglycane. Sie bilden Makromoleküle mit 20 - 200 Einheiten (SALITERNIK, GIVANT und BERMANN). Diese Substanzen sind für den osmotischen Druck des Stromas verantwortlich und somit für den Wassergehalt (MAURICE). Der spezifische Aufbau der Glycosaminoglycane bildet die Voraussetzung für die Ausbildung der regelmäßig gebauten kollagenen Fibrillen. Außerdem verleiht die Quellungsfähigkeit der Glycosaminoglycane dem Corneaparenchym die optische Konstanz und eine gewisse mechanische Festigkeit (MAURICE). Die Erhaltung dieses Zustandes ist von energieliefernden Prozessen abhängig.

Die DESCOMET'sche Membran stellt nach ROHEN eine "hypertrophierte Basalmembran" des Endothel's dar. Sie bildet mit 5 - 10u Dicke beim Menschen die innere Oberfläche des Stromas. Lichtmikroskopisch erscheint sie als homogene Masse, elektronenmikroskopisch lassen sich jedoch mehrere netzartige, aufeinanderliegende Zellschichten differenzieren (JAKUS).

Das Endothel ist die Begrenzung der Cornea zum Kammerwasser hin. Es wird von einer Lage sechseckiger Zellen gebildet. Diese Strukturen lassen sich im reflektierten Licht einer Spaltlampe darstellen. Im Endothel werden nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen zahlreiche Golgi-Apparate, Mitochondrien und große Mengen von rauhem endoplasmatischem Retikulum gefunden (HODSON). Diese Beobachtungen passen zu

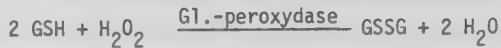
der von MAURICE 1969, MISHIMA 1967 und GREEN 1969 beschriebenen hohen Durchlässigkeit für niedermolekulare Substanzen und der Aktivität des Endothels.

Über die Biochemie der Hornhaut liegen umfangreiche Untersuchungen von DAVSON 1969, KINOSHITA und MASURAT 1959, REIM und Mitarbeiter 1965, SÜLLNER 1964, HERRMANN und HICKMAN 1956 und MAURICE 1969 vor. Die energieliefernden Prozesse in der Hornhaut waren auch Gegenstand der Untersuchungen, die KINOSHITA 1964, van HEYNINGEN 1969, ANDERSON und SPECTOR 1971 und PIRIE 1965 anstellten. In diesen Arbeiten finden sich Hinweise auf den Hexosemonophosphat Shunt und auf das GSH/GSSG System, dem wohl eine zentrale Steuerfunktion des Systems zukommt (JAKOB und JANDEL 1966). Glutathion ist ein Tripeptid mit einer Thiolgruppe. Die oxydierte Form liegt als Disulfid vor.

Zum einen ist Glutathion als Coenzym sechs verschiedener enzymatischer Reaktionen bekannt, zum anderen spielt es eine Rolle im Glukoseabbau, auf die noch eingegangen wird. Die Synthese von Glutathion findet in zwei ATP-verbrauchenden Schritten statt, was im Extrakt von Rinderlinsen mit Hilfe radioaktiv markierter Ionen von DAISLEY elegant bewiesen wurde. Daß auch der Abbau in der Linse des Auges stattfindet, kann aus der Tatsache geschlossen werden, daß im Linsenkern weniger GSH gefunden wurde als in der Peripherie. Die Oxydation von GSH wurde zuerst von MEROLA und KINOSHITA mit Wasserstoffperoxyd in zwei Schritten gezeigt.



Die Reaktion läuft bei Anwesenheit von Kupferionen innerhalb einer Stunde spontan ab. Die physiologische Oxydation zeigte PIRIE 1957 durch den Nachweis von Glutathionperoxydase in der Linse.

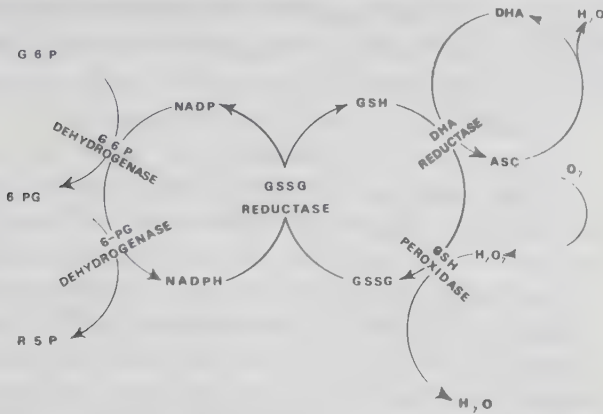


Die Reduktion von GSSG wird enzymatisch katalysiert durch die Glutathionreduktase (REES und PIRIE).

Schaut man die zahlreichen Veröffentlichungen durch, die sich mit Glutathion befassen, so lassen sich Nachweise in verschiedenen Körpergeweben, Gehirn, Auge, Leber, Niere und Blut finden. Wesentliche Hinweise auf eine Stoffwechselfunktion finden sich bei Arbeiten über die Erythrozytenmembran. Verschiedene Autoren schreiben dem Glutathion eine Schutzfunktion, eine membranstabilisierende Wirkung zu. VAN HEYNIGEN weist darauf hin, daß die Thiolgruppe der Eiweiße stabiler sind als GSH und folgert daraus, daß es keinen Beweis für Glutathion als Schutzagens gibt. Dagegen zeigen die Arbeiten von JAKOB und JANDEL, daß die Schutzfunktion von GSH wohl darin liegt, die oxydative Zerstörung von Oxyhämoglobin in Met- und Sulfhämoglobin durch die Wasserstoffperoxydbildung zu beherrschen. Durch selektive Blockierung von GSH konnte der HMP-Shunt gestoppt werden, ohne den EMBDEN-MEYERHOFF-Abbauweg zu beeinträchtigen. Die Oxydation von H_2O_2 war abhängig vom Glutathion. Diese Versuche lassen vermuten, daß wohl auch in der Hornhaut des Auges eine Beziehung zwischen dem Glutathion und dem HMP-Shunt zu suchen sein wird. Hohe GSH Konzentrationen bieten sich als Sauerstoff-carrier-System an, wo niedrige Cytochromoxydasekonzentrationen herrschen. Glutathionoxydase würde hier über das GSH - GSSG - System die "Entgiftung" des Stoffwechsels von H_2O_2 anstelle der Katalase übernehmen.

KINOSHITA postulierte 1964 die Autoxydation von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure und die Entstehung von H_2O_2 . PIRIE konnte dann 1965 zeigen, daß die Reaktion spontan mit molekularem Sauerstoff ablief. Die Reaktion ist nicht enzymatisch gesteuert und wird durch Licht katalysiert. GSH reagiert nun mit H_2O_2 zu GSSG und H_2O . Diese Reaktion wird von der Glutathionperoxydase gesteuert. Anschließend wird GSSG mit der Glutathionreduktase reduziert, wobei über NADPH/NADP der Anschluß an den Hexosephosphatshunt und damit an den Glukosestoffwechsel hergestellt wird.

ANDERSON und SPECTOR zeigen neben dem oben beschriebenen Weg die direkte Oxydation durch Ascorbinsäure. Eine enzymatische



Oxydation von Ascorbinsäure findet nach ANDERSON und SPECTOR nur in unwesentlichem Maße statt, so daß der Ascorbinsäurespiegel, da man UV-Licht in der Cornea voraussetzen darf, als Maß für die H_2O_2 - Konzentration des Gewebes genommen werden kann. Bei niedrigem H_2O_2 - Spiegel, wie er gewöhnlich herrscht, findet eine träge Oxydation von GSH durch GSH-Peroxydase statt.

Auf diese Weise wäre auch die Reoxydation größerer Mengen NADPH denkbar, eine Voraussetzung, die für diesen Stoffwechselweg von entscheidender Bedeutung ist. Die Arbeiten von KINOSHITA zeigen die Wichtigkeit des HMP-Shunts besonders für das Epithel. Es gelang ihm, mit markierten C-Atomen den Abbau der Glucose über den EMBDEN-MEYERHOFF-Zyklus und den HMP-Shunt quantitativ zu bestimmen. Danach sollen in der Retina des Rindes 10 %, in der Linse 14 % und im Corneaepithel 35 % über den HMP Shunt abgebaut werden. Der Wert für das Corneaepithel ist höher als der anderer Gewebe.

Nach gleicher Methode arbeitete KOMOTO bei seinen Untersuchungen an Affenhornhäuten. Er stellte einen Zusammenhang zwischen Lagerung und Verhältnis der Abbauege her. Nach seinen Ergebnissen spielt der HMP-Shunt gegenüber dem EMBDEN-MEYERHOFF-Abbauege die überwiegende Rolle, wobei der Anteil des HMP-Shunts mit der Zeit der Lagerung steigt.

Fragestellung

Die bisher vorliegenden Ergebnisse über die Metabolitspiegel des HMP-Shunts variieren besonders stark beim GSH. Die meisten Untersucher verzichten auf die Messung von GSSG, was diese Messungen für die Betrachtung im Zusammenhang mit dem Hexosemonosphat-Shunt uninteressant macht. Die Bestimmung von GSH ist in besonderer Weise pH-abhängig, eine Tatsache, die bei der Extraktion der Metabolite mehr Beachtung finden sollte. Eine Messung der beteiligten Redoxsysteme im Hexosephosphatshunt erscheint wünschenswert, um das Metabolit-"Muster" der Reaktionen des Glutathion-Hexosephosphatsystems zu erkennen.

HERRMAN und HICKMAN versuchten bei der Trennung der Corneaschichten verschiedene Verfahren; dabei stellten sie unterschiedliche Metabolitspiegel je nach Verletzungsgrad der Zellen und der Schnelligkeit der Abrasio fest. HOHORST entwickelte bei seinen Untersuchungen an der Rattenleber das Frierstoppverfahren, das nach seinen Ergebnissen dem "in vivo" Status am nächsten kommt. Bei diesem Verfahren werden Gewebstücke zwischen zwei auf -196°C gekühlten Aluminiumblöcke gebracht, so daß sie schlagartig einfrieren. REIM, MEYER und FOERSTER entwickelten das Frierstoppverfahren für die Cornea des Rindes und erhielten so die wohl genauesten Werte über die Metabolitspiegel in der Rindercornea. Messungen des GSH/GSSG Systems mit der Frierstoppmethode wurden bisher noch nicht durchgeführt.

REIM und MEYER zeigten in ihren Untersuchungen an Corneaepithelien von Kaninchen und Rindern die Abhängigkeit des ATP/ADP-Quotienten von der Fixierungsmethode. Aus diesen Untersuchungen und auch aus solchen von HOHORST an der Rattenleber ist bekannt, daß die energiereichen Phosphate innerhalb weniger Sekunden bei mechanischer oder thermischer Schädigung zerstört werden. Der Quotient von ATP zu ADP wird kleiner. Da die Träger der chemischen Energie bei den Stoff-

wechselvorgängen hauptsächlich Adenosintriphosphate sind, die bei energieverbrauchenden Prozessen in niederwertigere Adenosinphosphate umgebaut werden, erscheint es sinnvoll, besonders nach den Ergebnissen von REIM und MEYER, den ATP/ADP-Quotienten als Maß für die Leistungsfähigkeit der Präparations- und Aufbereitungsmethoden zu nehmen. Eine Bestimmung von GSH, GSSG und von Metaboliten des HMP-Shunt mit gleichzeitiger Messung des ATP/ADP-Quotienten ließe eine Wertung der Ergebnisse zu, wobei sich außerdem die Möglichkeit ergäbe, Präparationsfehler einzelner Augen sofort zu erkennen.

Von diesen Messungen können außerdem Aussagen über die Stoffwechselveränderungen erwartet werden, die durch die präparationsbedingte Zellzerstörung bei den bisherigen Verfahren entstanden sind.

Methodischer Teil

Gewinnung des Materials.

Die in den Untersuchungen verwendeten Rinderaugen erhielten wir vom Marburger Schlachthof. Für die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung der Räume sei hier dem Schlachthofdirektor Herrn Dr. Dr. Wandt gedankt. Wir erhielten die Augen sofort nach dem Ausbluten und Abtrennen der Köpfe. Zwischen dem Tod der Tiere und der Aufbereitung und Fixierung der Augen vergingen zwei bis drei Minuten. Sofort, nachdem der Schlachter die Augen enucleiert hatte, wurden die Bulbi mit physiologischer Kochsalzsösung gespült, und so von Blut- und Haarresten befreit. Dann wurden die Augen je nach Präparationsart sofort weiterverarbeitet.

Methode I

Die Augen wurden nach dem Säubern in eine feuchte Kammer gelegt, wobei besonders auf eine einwandfreie Belüftung geachtet wurde. Es wurden etwa je zehn Augen gesammelt, die dann ins Labor gebracht wurden, um eine Verunreinigung bei der Abrasio zu vermeiden. Das Epithel wurde nun, wenn es im schräg auffallenden Licht keine mechanischen Läsionen zeigte, mit dem Hockymesser vom Limbus ausgehend zum Zentrum hin vorsichtig abradiert, wobei ein 1 bis 2 mm starker Epithelring außen stehengelassen wurde. Das so gewonnene Material wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -30°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Methode II

Bei der zweiten Methode wurde noch im Schlachthof sofort nach der Reinigung das Gewebe nach der von REIM entwickelten Frierstopmethode eingefroren. Dabei wurden zwei Aluminiumstempel verwendet, die es durch eine konvexe und eine konkave Fläche erlaubten, das Gewebe an allen Stellen gleichschnell und vor allen Dingen ohne Auffältelung und

und Quetschung zu gefrieren. Die Sklera wurde ungefähr zwei Millimeter von der Cornea - Sklera Grenze mit einem kleinen Skalpell inzidiert, dann wurden mit einer Schere die Cornea mit einem Skleralring ausgeschnitten, der bei der weiteren Präparation als Pinzettengrifffläche diente, und der auf diese Weise die Cornea vor nachträglichen mechanischen Läsionen schützte. Nach dem faltenfreien Auflegen der Cornea auf den konvexen, gekühlten Block wurde der konkave ebenfalls gekühlte Block kurz auf die Cornea gepresst. Die so erhaltene weiß glänzende, porzellanharte Cornea wurde sofort in flüssigen Stickstoff getaucht und in luftdicht schließenden Gefäßen bis zur weiteren Verwendung in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Das Epithel wurde erst jeweils vor der Aufbereitung der Extrakte unter flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser abgekratzt und zerkleinert. Als besonders schwierig erwies es sich, das Epithel wasserfrei zu halten. Dieses Problem wurde aber durch dauerndes Nachfüllen von Stickstoff und weitgehende Vermeidung von Luftkontakt gelöst.

Bei der Abrasio wurden durchschnittlich nach der Methode I 50 mg, nach der Methode II 40 mg Epithel gewonnen. Um Wiege- und Pipettierfehler klein zu halten wurden pro Extrakt zwei Hornhäute verwendet.

Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe

Die noch gefrorenen Gewebestücke gaben wir in jeweils 1,5 ml eiskalte 0,5 n Perchlorsäure und zerkleinerten sie in einem Glas in Glas Homogenisator (POTTER) unter ständiger Kühlung in Eiswasser. Nachdem die Lösung zweimal drei Minuten homogenisiert worden war, wurde die nun gleichmäßig milchig trübe Flüssigkeit 5 Minuten bei 4000 U/min in einer Laborzentrifuge Typ Christ Universal Junior III zentrifugiert. Der klare Oberstand wurde in ein 5ml Rührgefäß gegeben, das

Sediment mit 0,5 ml Perchlorsäure aufgerührt, erneut zentrifugiert und der Überstand zu dem anderen in das Rührgefäß gegeben.

Dann folgte die Neutralisation des Extraktes mit 10 n KOH, wobei unter ständigem Rühren und unter Messung des pH mittels einer Glaselektrode bis zu einem pH von 6,8 titriert wurde. Das ausgefallene Perchlorat wurde sodann durch erneutes Zentrifugieren in der Zentrifuge Omikron der Firma Christ, Osterode, bei 30.000 x g getrennt. Der klare Überstand wurde in verschlossene Kunststoffgefäße umgefüllt, und bis zur Messung im Eisbad aufbewahrt.

Um einen Überblick über die Extraktverdünnung zu haben, wurde der Faktor des Feuchtgewichts bestimmt. Er gibt das Verhältnis von Gesamtvolumen zu Gewebsgewicht an. Bei den Versuchen gelang es durch Einsetzen von zwei Hornhautepithelien pro Messung den Faktor zwischen 20 und 30 zu halten.

Die beschriebene Extraktion im sauren Extrakt wurde bei folgenden Metaboliten angewandt: GSH, GSSG, ATP, ADP, NADP, G-6-P.

Die Extraktion von NADH und NADPH erforderte eine andere Arbeitsweise, da diese Stoffe im sauren Medium instabil sind. Nach BERGMEYER wurde in 1 ml 0,5 n alkoholische Kalilauge, die auf -17°C gekühlt war, unter Rühren mit dem Magnetrührer das Epithel zweier Hornhäute gegeben. Das Gefäß wurde mit einem Glasstopfen verschlossen. Nach fünfminütiger Erwärmung im 90°C Wasserbad unter Schütteln entstand eine klare, gelbbraune Flüssigkeit, die dann schlagartig auf 0°C abgekühlt wurde. Die Lösung wurde 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann wurde 0,5 ml Triäthanolamin - HCL-Phosphat-Mischung langsam unter Kühlung und Rühren zugegeben bis ein pH von 7,8 erreicht war. Die Lösung wurde

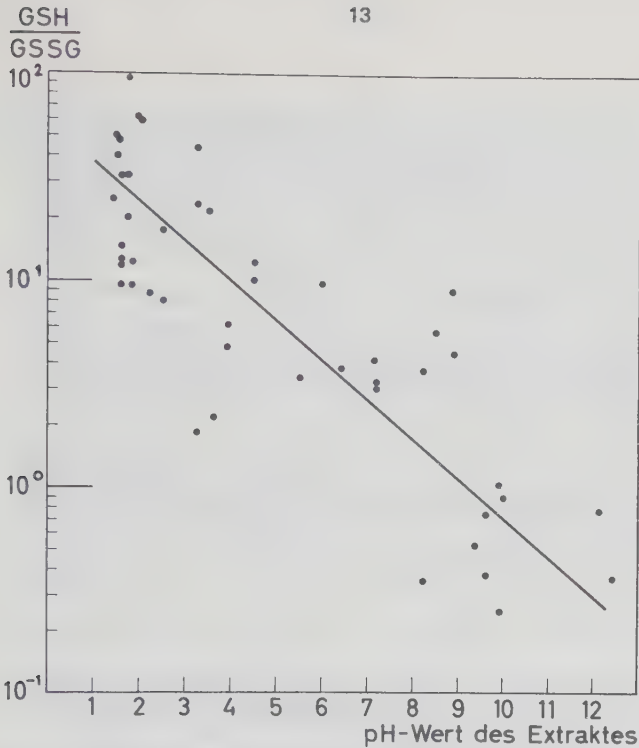
in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 10 Minuten bei 25 °C stehen gelassen. Anschließend wurde in der Omikron Zentrifuge bei 30.000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dekantiert und zur sofortigen Messung verwendet. Wegen der hohen Zerfallsrate von TPNH im fertigen Extrakt mußte sofort gemessen werden, und die Untersuchung mußte auf eine Messung pro Extrakt beschränkt bleiben.

Diese Methode wurde deshalb durch eine zweite ergänzt. Hierbei wurde direkt nach dem Neutralisieren eine enzymatische Oxydation eingeleitet. NADH und NADPH wurden durch GDH und GLDH in NAD und NADP überführt. Unter ständigem Rühren wurden zugegeben:

0,2 ml DAP
 0,01 ml GDH unverdünnt
 0,01 ml a-Ketoglutar säure c = 20
 0,01 ml gesättigte Amoniumsulfatlösung
 0,01 ml GLDH unverdünnt.

Dann wurde 5 Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde dann eine Eiweißfällung vorgenommen und verfahren, wie bei der sauren Extraktion schon beschrieben.

Zur Aufbereitung der GSH Extrakte wurden Versuche gemacht, um die Methode zu verbessern. Der pK_s der GSH erlaubt den Schluß, daß GSH in alkalischer Lösung schnell zerfällt. Um zu erkennen, bis zu welchem ph-Wert bei der Aufbereitung neutralisiert werden kann, ohne GSH zu zerstören, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die ph-Werte der Extrakte variiert wurden, und in Abhängigkeit davon der GSH/GSSG-Quotient bestimmt wurde.



Werte von sofort warm abradierten Epithelien

Ordinate logarithmisch geteilt

Aus der Kurve ergibt sich ein steigender GSH-Verlust bei steigendem pH. Bis zu einem pH von 3 lassen sich noch keine Verluste feststellen. In den folgenden Versuchen wurde GSH bei der Extraktion bis zu einem pH von 3 neutralisiert. Sonst wurde wie bei der oben beschriebenen Methode der sauren Extraktion verfahren. Nach Zugabe der TRAP/EDTA-Puffers wurde in der Cuvette ein pH von 6,8 gemessen. Der GSH Gehalt blieb in dem aufbereiteten Extrakt stabil.

Metabolitbestimmung

Die quantitative Analyse zur Bestimmung der Metabolite wurde nach dem enzymatisch - optischen Verfahren (WARBURG) vorge-

nommen. Bei dem Verfahren wird eine photometrische Konzentrationsmessung durchgeführt. Bei definierten Bedingungen ist die Schwächung der durchfallenden Lichtintensität proportional der Konzentrationsänderung des absorbierenden Stoffes in der Lösung. Gemessen werden bei diesem Verfahren Extinktionsdifferenzen, die absoluten Werte haben keine Aussagekraft.

Die GSH/GSSG Bestimmungen sowie die NADP und die NADPH (indirekte Methode) Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Diese Methode erlaubt gleich bei der Messung eine grobe Kontrolle, denn schon bei kleinsten Verunreinigungen der Reagezien oder des Wassers ist die Proportionalität nicht mehr gewahrt. Als weitere Kontrolle wurden Nachstarts mit einer definierten Menge des zu messenden Metaboliten durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, daß nur frisch angesetzte Lösungen verwendet wurden.

Die Messungen wurden an einem Eppendorf-Photometer der Firma Netheler und Hinz (Hamburg-Wellingsbüttel) sowie die GSH/GSSG Messungen ausschließlich an dem Photometer BECKMAN - DK 2A (Ratio Recording Spectrophotometer der Firma Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California).

An Cuvetten wurden benutzt: im Eppendorf Photometer Halbmikrocuvetten mit einer Schichtdicke von 2 cm, im Beckman Photometer Normalcuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die GSH Bestimmungen konnten nur im Beckman Photometer mit 1 cm Quarzcuvetten bei einer Wellenlänge von 240 nm durchgeführt werden. Getestet wurde bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH 7,6 und einer Reaktionstemperatur von 25 °C.

Bei den Messungen wurde für Mengen unter 0,5 ml das Mikrosystem Marburg (Eppendorf Pipetten, Firma Nethler und Hinz) benutzt.

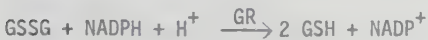
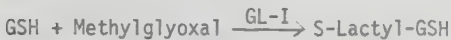
Die biochemischen Reagenzien wurden von der Firma C. F. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim-Waldhof bezogen. Destilliertes Wasser wurde mit einer Anlage der Firma A. Lang, Zürich, hergestellt.

Wir verwendeten die von REIM für die Rindercornea angegebenen Testvorschriften. Bei der NADPH Messung hielten wir uns an die von M. KLINGENBERG beschriebenen Verfahren und modifizierten sie für die Cornea.

Testvorschrift:

Kombinierte Bestimmung von Glutathion, reduzierte und oxydierte Form.

Reaktion:



Testzusammensetzung:

Filter 240 mu, Quarzcuvette S = 1

Kalium-Natrium-Phosphatpuffer	0,50 ml
-------------------------------	---------

Methylglyoxal 1 : 200	0,01 ml
-----------------------	---------

Extrakt	0,50 ml
---------	---------

Wellenlänge 240 mu

Bestimmung von GSH:

Start: Glyoxalase I	1:10	0,01 ml
---------------------	------	---------

Gleiche Cuvette bei 340 mu

NADPH	c = 8	0,02 ml
-------	-------	---------

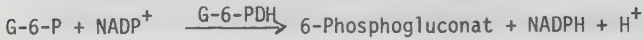
Wellenlänge 340 mu

Bestimmung von GSSG

Start: Glutathionreduktase	0,01 ml
----------------------------	---------

Kombinierte Bestimmung von ATP und G-6-P.

Reaktionen:



Testzusammensetzung:

Spreizung: 0 - 0,5; Filter 366; Halbmikrocuvette d = 2

TRAP		100 mM mit	
EDTA		1 mM; ph 7,6	0,50 ml
MgCl ₂	100 mM	0,01 ml	
NADP	25 mM; c = 20	0,02 ml	
Extrakt		0,50 ml	

Bestimmung von G-6-P:

Start: G-6-PDH 1 : 20 0,01 ml

nach Ablauf der Reaktion:

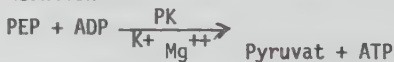
Glukose M/10

Bestimmung von ATP:

Start Hexokinase c = 10 1 : 10 0,01 ml

ADP Test:

Reaktion:



+Testzusammensetzung:

Spreizung 0 - 0,5; Filter 366 mu

Halbmikrocuvette d = 2

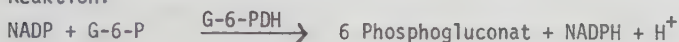
TRAP	100 mM mit	
EDTA	1 mM;	0,50 ml

MgCl ₂	100 mM	0,01 ml
NADH	11 mM, c = 8	0,01 ml
PEP - C	32 mM, c = 15	0,02 ml
LDH	1 : 10, c = 5	0,01 ml
Extrakt		0,50 ml

Start: Pyruvatkinase c = 2 mg/ml 0,002 ml

NADP Test

Reaktion:



Testzusammensetzung:

Filter 334 mu, Spreizung 0 - 0,5,

Halbmikrocuvette d = 2

TRAP 100 mM mit

EDTA 1 mM, ph 7,6 0,50 ml

G-6-P c = 30 0,02 ml

Extrakt 0,50 ml

Start G-6-PDH 1 : 40 0,01 ml

Kombinierte Bestimmung von NADH und NADPH

Direkte Methode

Reaktion:



Testzusammensetzung:

Filter 334, Spreizung 0 - 0,5,

Halbmikrocuvette.

TRAP	100 mM mit	
EDTA	1 mM, pH 7,6	0,50 ml
DAP		0,02 ml
NH ₄ CL	gesättigt	0,01 ml
Extrakt		0,50 ml

Bestimmung von NADH:

Start GDH	1 : 20	0,01 ml
sofort nach Ablauf der Reaktion:		
a-Ketoglutarat	c = 20	0,02 ml

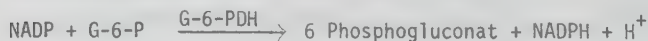
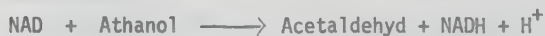
Bestimmung von NADPH

Start GLDH	1 : 40	0,01 ml
------------	--------	---------

Kombinierte Methode zur Bestimmung von NADH und NADPH Die Substanzen sind vorher, wie oben beschrieben, in NAD und NADN enzymatisch überführt worden.

Indirekte Methode.

Reaktionen:



Testzusammensetzung:

Filter 334, Spreizung 0 - 0,5,

Halbmikrocuvette d = 2.

Pyrophosphatpuffer	0,50 ml
Athanol 96 %	0,01 ml
Extrakt	0,50 ml

Bestimmung von NAD

Start ADH	1 : 10	0,01 ml
G-6-P	c = 30	0,01 ml

Bestimmung von NADP

Start G-6-PDH 1 : 20

0,01 ml

Berechnung der Einzelwerte

Der Metabolitgehalt der einzelnen Proben wurde nach folgender Formel ausgerechnet:

$$\frac{\text{Mgl}}{\text{gfrisch}} = \frac{E \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen}}{d \times \text{Spreizung} \times \text{Einsatzvolumen} \times \text{Gewebsgewicht}}$$

E = Extinktionsdifferenz

= Extinktionskoeffizient

für 240 nm = $3,37 \times 10^{-6}$ für 340 nm = $6,28 \times 10^{-6}$ für 344 nm = $6,09 \times 10^{-6}$ für 366 nm = $3,3 \times 10^{-6}$

d = Schichtdicke der Cuvette

Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung beschränkten wir uns auf die Berechnung der Mittelwerte, der Streuung, der Standardabweichung und der Standardabweichung der Mittelwerte.

Die Anzahl der Versuche = n

Mittelwert: $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

Standardabweichung: $s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}{n - 1}}$

Standardabweichung

der Mittelwerte $s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$

Ergebnisse

Die nachstehende Tabelle I zeigt den Methabolitstatus, gemessen nach der herkömmlichen Aufbereitungsmethode. Das Epithel wurde nach der Abrasio sofort weiterverarbeitet.

Tabelle I

Metabolit	N	$\bar{x}$	Sm	Abweichung in %
GSH	21	5614	868	15,4
GSSG	16	183	15	8,1
GSH/GSSG	16	37,6	7,1	19
ATP	5	1012	166	16,0
ADP/	5	1974	218	11,2
ATP/ADP	5	0,53	0,11	
G-6-P	5	619	154	24

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

GSH und GSSG bis pH 3 neutralisiert

N = Anzahl der Proben

$\bar{x}$ = Mittelwert aller Proben

Sm = Standardabweichung der Mittelwerte

Die Standardabweichung der Mittelwerte liegt zwischen 8,1 und 24 %. Der Vergleich mit den bisher vorliegenden Ergebnissen zeigt, daß der Wert höher liegt als die von ANDERSON und SPECTOR angegebenen 4.050 g/Mol Frischgewicht. Der ATP-Spiegel liegt niedriger als es nach den Ergebnissen von REIM zu erwarten war. Der relativ hohe ADP-Spiegel paßt jedoch zu dem Wert. Die Standardabweichung der Mittelwerte ist bei ATP und ADP relativ hoch. Die Erklärung kann darin gesehen werden, daß

die Augen der Tiere gesammelt und zur Präparation ins Labor gebracht wurden. Die Augen können also von der Schlachtung bis zur Präparation unterschiedliche Zeitabstände gelagert haben. (1 1/2 bis 2 1/2 Stunden). Nach den Lagerungsversuchen von FOERSTER verschieben sich die Metabolitspiegel von ATP und ADP jedoch in diesem Zeitraum nur geringfügig. Die erhöhte Standardabweichung vom Mittelwert wird wohl ihren Grund in der Präparationmethode haben, bei der beim Abradieren wohl immer eine ungleichmäßig hohe Anzahl von Zellen zerstört wird. Der ATP/ADP-Quotient war bei der Präparationmethode in dieser Größenordnung zu erwarten. Nach Arbeiten von REIM und MEYER kann ein Quotient von 1 bei der Methode der warmen Abrasio erwartet werden.

Der relativ hohe G-6-P-Spiegel stimmt mit anderen Beobachtungen überein. REIM und MEYER beschreiben ein starkes Ansteigen des G-6-P-Spiegels innerhalb der ersten drei Stunden nach Abbruch der Blutzufuhr. Die hohe Standardabweichung von 24 % ist wohl durch diese Kinetik zu erklären.

Tabelle II

Metabolit	N	$\bar{x}$	Sm	Abweichung in %
GSH	21	2769	132	4,7
GSSG	20	373	30	8,0
GSH/GSSG	19	10	1,08	
ATP	11	2590	95	3,6
ADP	11	308	8,7	2,8
ATP/ADP	11	10,5	0,51	
TPN	22	165	10	6,0
TPNH	15	235	21	8,9

DPNH	8	64	8	15,6
G-6-P	6	109	7	6,4
TPNH	8	196	17	8

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

GSH und GSSG bis pH 3 neutralisiert

N = Anzahl der Proben

$\bar{x}$ = Mittelwert aller Proben

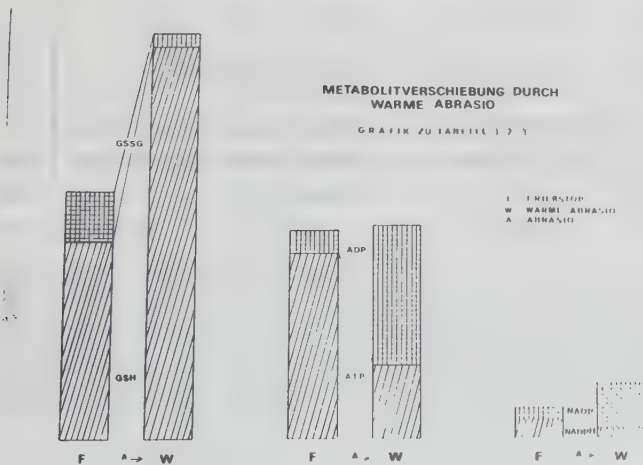
S_m = Standardabweichung der Mittelwerte

Bei der Methode II (Frierstopmethode) zeigen die Werte eine wesentlich geringere Standardabweichung. Sie liegt zwischen 2,8 und 15,6 %. Der GSH-Wert ist wesentlich niedriger als bei der Methode der warmen Abrasio. Mit 4,7 % mittlerer Standardabweichung zeigen die Werte eine große Konstanz. Es gelang mit der Frierstopmethode die Menge der nicht abzentrifugierbaren, lichtabsorbierenden Schwebestoffe wesentlich geringer zu halten. Selbst bei Testeinsätzen von 0,8 ml konnte der Photometer im Meßbereich gehalten werden, während bei der Methode I meist schon bei 0,3 ml Extrakt die Streuung zu groß war. Dieser unterschiedliche Verunreinigungsgrad legt den Schluß nahe, daß die Frierstopmethode neben der schnelleren Fixierung auch eine schonendere Abrasio bietet. So gelang es auch nach einiger Übung das Epithel unter flüssigem Stickstoff mit einem Star-messer in etwa stecknadelkopfgroßen Stücken abzuspren-gen. Dadurch blieben die übrigen Schichten der Cornea unverletzt und Verunreinigungen des gewonnenen Epithelmaterials wurden weitgehend vermieden.

Ähnliche Beobachtungen ließen sich auch bei der GSSG-Meßreihe machen; allerdings bestanden hier wegen der größeren Wellen-länge keine Schwierigkeiten bei der Messung. Bei den GSSG

Tests ließ sich häufig eine langsame Umsetzung des NADPH beobachten, die auch beim Wechsel der Reagenzien nicht vermieden werden konnte.

Die ATP und ADP Messungen der Frierstoppreihe zeigen mit 3,6 % und 2,8 % die geringste mittlere Standardabweichung. Die Werte stimmen mit den von REIM und FOERSTER gewonnenen Ergebnissen überein. Mit einem Extrakt wurden jeweils GSH/GSSG sowie ATP und ADP Messungen durchgeführt. Da wegen der relativ geringen Menge ADP und GSSG das Einsatzvolumen für die beiden Substanzen je 0,5 ml betragen mußte, reichte die Extraktmenge nicht bei allen Bestimmungen aus, um alle Messungen durchzuführen. Beim Einsetzen größerer Mengen Epithel (3 oder 4 Augen) zeigte sich jedoch, daß die Verunreinigungen wesentlich zunahmen. Es wurde deshalb bei allen Versuchen konstant mit einem Einsatz von zwei Epithelien gearbeitet. Die daraus gewonnenen Extrakte ermöglichten zufriedenstellende Messungen.



Veränderungen der Metabolitspiegel durch warme Abrasio

Die Abbildung zeigt die Einflüsse der mechanischen Schädigung bei der Präparationsmethode I. Nach Lagerungsversuchen von FOERSTER kann die Veränderung der Metabolite in einer feuchten Kammer innerhalb der ersten Stunden vernachlässigt werden. Die Werte bleiben bei guter Belüftung praktisch unverändert. Unter dieser Voraussetzung lassen die Änderungen im Metabolitspiegel Schlüsse auf den Einfluß der Präparationsmethode zu. Veränderungen bei der Abrasio, die bei dem ATP/ADP System schon bekannt waren, treffen offensichtlich auch in ähnlicher Weise für das GSH/GSSG System zu.

Nach Werten von LUTHE, der nach gleicher Methode bei warmer Abrasion NADPH und NAD^+ gemessen hat, lassen sich die Aussagen auch auf das NADPH/NAD System übertragen.

Tabelle 3

NADP	NADPH	Summe	Methode	Messung
126 ± 6	612 ± 38	738	warme Ab.	LUTHE
165 ± 10	235 ± 21	400	Frierstop	BEERMANN

Auch das NADP/NADPH System unterliegt, wie die anderen Redoxsysteme des HMP Shunts präparationsbedingten Verschiebung.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu dienen, genauere Aussagen über die den HMP-Shunt betreffenden Metabolite machen zu können. Nach JAKOB und JANDEL kommt dem Glutathion eine zentrale Steuerfunktion des HMP-Shunts zu. Die Menge des gefundenen GSH läßt umgekehrt Rückschlüsse auf Vorhandensein und Ausmaß dieses Abbauweges zu. Besonders interessant scheinen diese Untersuchungen im Hornhautepithel, da hier nach vergleichenden Messungen von OGUCHI, HIDA und SHIMIZU der höchste Glutathionspiegel im Auge herrscht.

Um eine bessere Übersicht und eine einfachere Einordnung der Ergebnisse zu erhalten, ist es interessant, die GSH und GSSG Werte mit den Ergebnissen der Literatur zu vergleichen.

Tabelle 4

GSH/GSSG Konzentrationen im Corneaepithel des Rindes bei verschiedenen Präparationsmethoden.

GSH	GSSG	Methode	Literatur
2994	--	rotierende Bürste	HEERMANN
4160	--	warne Messung	SOLLMANN
4050	--	warne Messung	ANDERSON/SPECTOR
3637	1149	warne Messung	LUTHE *
5614	183	warne Messung	BEERMANN
2769	373	Frierstop	BEERMANN

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

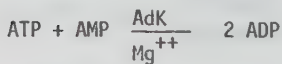
Bei einer Bestimmung, die nur den reduzierten Teil des Glutathion berücksichtigt, muß die vorne gezeigte Abhängigkeit in die Bewertung mit einbezogen werden.

*

Messung bei pr. 7

Um die Aussagekraft unserer Werte zu erhöhen, wurde der ATP/ADP Quotient in den gleichen Proben bestimmt. Die Adenoinphosphate eignen sich deshalb besonders für diese Untersuchungen, weil die statistische Steuung relativ gering ist und ihre Summe für jedes Gewebe weitgehend konstant ist. Das Verhältnis von ATP zu ADP zeigt den Energiezustand des Gewebes an. Nach HOHORST ist die Höhe des ATP/ADP Quotienten auch eine sichere Anzeige für die Qualität der Präparationsmethode. Mechanische und thermische Schädigungen lassen den Quotienten in Sekunden fallen. Nach Berechnungen von REIM entsprechen dem "in vivo" Status im Hornhautepithel ein Quotient, der über 9 liegt. Diese Forderungen wurden durch die Versuche mit einem ATP/ADP Quotienten von 10,5 erfüllt, wenggleich Werte von SCHMIDT (12,2) und MEYER (17) nicht erreicht wurden. Allerdings bezogen sich diese Werte auf Kaninchenhornhäute, die im Labor unter besseren Bedingungen präpariert werden konnten. Der Wert von 10,5 liegt in der zu erwartenden Größenordnung.

Bei den Ergebnissen der Methode I fällt der niedrige ATP- und der hohe ADP-Spiegel auf. Der Quotient von 0,5 zeigt deutlich den Unterschied der beiden Methoden. Energiereiche Adenosintri-phosphate sind hier also offensichtlich beim Abradieren des Epithels in Adenosindiphosphate umgewandelt worden. Nach REIM reicht die Aktivität der Adenylkinase aus, um diesen Vorgang in kürzester Zeit zu katalysieren.



Die Veränderung in diesem System läßt auf eine beträchtliche mechanisch induzierte Aktivität in der Zelle schließen. Von diesen Veränderungen bleibt auch das GSH/GSSG System nicht ausgenommen. Die Werte von 5.641 zu 2.769 bei GSH und von 183 zu 373 bei GSSG zeigen an, daß ein Teil der GSSG bei der Abrasio verloren geht, GSH jedoch bei der Abrasio vermehrt auftritt. Es wäre möglich, daß bei der Abrasio normalerweise

an das Zellprotein gebundenes GSH bei der Zerstörung des Epithelverbandes freigesetzt wird.

Nimmt man GSH und GSSG als geschlossenes Redoxsystem an, so muß die Summe der bei den Methoden gefundenen Werte konstant sein. Die Summe 2 GSSG + GSH beträgt bei der Methode I 5.98P g/Mol Frischgewicht, bei der Methode II 3.515 g/Mol Frischgewicht. Die Summe differiert also stark. Als Erklärung hierfür muß angenommen werden, daß Glutathion zum Teil an Proteine gebunden vorliegt und in der Messung nur das freie Glutathion erfaßt wird. HERRMANN und MOSES glauben an eine Bindung durch Disulfidbrücken zwischen den Sulfhydrylgruppen des Glutathion und den SH-Gruppen von Proteinen.

Unter diesen Umständen erscheint es interessant, die bisher vorliegenden Werte auf die Präparationsmethode zu prüfen. ANDERSON und SPECTOR abradieren die Epithelien mit einem Messer. HERRMAN und Mitarbeiter trennten das Epithel mit einer schnell rotierenden Kamelhaarbürste. Die unterschiedlichen Werte mögen einerseits durch physiologische Streuungen zu erklären sein, andererseits jedoch ist die Metabolitverschiebung bei der Abrasio ein bisher noch nicht genügend berücksichtigter Faktor.

REIM und MEYER beschreiben bei Untersuchungen über Metabolitveränderungen des Corneaepithels bei Anaerobiose einen starken G-6-P-Anstieg, während der aneroben Phase. Analog hierzu ist bei der Methode I ein wesentlich höherer G-6-P-Spiegel zu finden, während die Werte bei der Frierstopmethode an der Grenze der Nachweisbarkeit lagen. Die Erhöhung der G-6-P-Werte spricht nach Befunden von HOHORST, KREUTZ und REIM für das Einsetzen glykolytischer Stoffwechselreaktionen. Die gemessenen G-6-P-Werte lassen sich gut in dieses Bild einordnen.

Bezieht man die NADP/NADPH-Werte in diese Überlegungen mit ein, so fällt auch hier auf, daß die stabilere oxydierte Form bei der warmen Abrasio in größerer Menge auftritt. Der NADP-Wert bei der Frierstopmethode ist bei kleinerer Gesamtmenge höher als der Wert bei der warmen Abrasio.

Hieraus läßt sich deuten, daß bei der mechanischen Gewebsverletzung aus NADP, NADPH entsteht, daß also nach der Zerstörung physiologischer Verhältnisse ein stabiler Zustand des Systems entsteht, der aber nicht unbedingt dem Zustand in der lebenden Zelle entspricht. Die unterschiedlichen Gesamtsummen (Tabelle 3) deuten darauf hin, daß die Änderung der Metabolit-spiegel nicht nur das hier betrachtete System betreffen.

Es erscheint sinnvoll, um genauere Aussagen über Metabolit-spiegel machen zu können, nur Wertepaare (oxydierte und reduzierte Form) zu verwenden. Die Untersuchungen mit der Frierstopmethode zeigen, daß Zweifel berechtigt sind, ob die mit den Methoden der warmen Abrasio gemessenen Metabolit-spiegel, wirklich den Zustand der lebenden Zelle darstellen.

Zusammenfassung

1. Metabolite des HMP-Shunts wurden in der Rindercornea mit Hilfe von zwei verschiedenen Präparationsmethoden bestimmt. Mit der Frierstopmethode wurden genaue Werte für GSH 2.769 und GSSG von 373 Mol/g Frischgewicht bestimmt.
2. Parallel zu den Versuchen wurde an den gleichen Proben der ATP/ADP Quotient bestimmt. Der Quotient lag bei der Frierstopmethode bei 10,5 %, was als Maß für die Gültigkeit der Präparationsmethode und die Signifikanz der Ergebnisse gewertet werden kann.
3. Durch Methodenvergleich wurden Aufschlüsse über die Metabolitverschiebungen im Epithel bei mechanischer Gewebszerstörung bei der Abrasio gewonnen.

- AONO, H.: Elektron microscopical studies on the cornea.
 Fol. phtal. pap. 2, 331-337 (1961a)
 In: Rohen, Handbuch der mikroskop. Anatomie des Menschen
 III/4, b 4.
- ANDERSON, E. I. and SPECTOR, Abraham:
 Oxidation-reduction reactions involving ascorbic acid
 and the hexosemonophosphateshunt in corneal epithelium
 Investigative Ophthalmologie Volume 10 No. 1.
- BERGMEYER, H.-U.:
 Methoden enzymatischen Analyse
 Verlag Chemie, Weinheim 1962
- DAISLEY, K.:
 Effect of radiation on the biochemistry of the lens
 Thesis University of Oxford 1957
- DAVSON:
 The Eye Bd. 1, Vegetative Physiologie and Biochemistry
 Academic Press New York, London 1969
- DELBROCK, A.:
 Enzymverteilungsmuster gefäßloser Gewebe.
 Klin.Wschr. 41, 488,493 (1963)
- DUKE, ELDER and PERKINS
 The transparency of the cornea
 Backwell Sci. Publ. Oxford 1960
- FÜRSTER, K. H.:
 Über die Verteilung der Metabolite des energieliefernden
 Stoffwechsels in der Rindercornea unter besonderer Berücksichtigung der Substantia propria.
 Inaugural-Dissertation Marburg 1969.
- GRAYMORE, C. N.:
 The effect of pyruvate concentration on the rate of reaction
 Exp. Eye Res. 5, 325-328 (1966)

GREEN, K., GREEN, M.A.:

Permeability to water of rabbit corneal membranes.
Amer. J. Phys. 217, 635-641 (1969)

HERRMANN, H. and F. Hickman:

Exploratory studies on cornea metabolism.
Bull. Johns Hopk. Hosp. 82, 225 (1948)
Zit. aus Biochemistry of the eye, ed.
A. Pirie and R. van Heyningen, S. 151
Blackwell Sci.Publ.; Oxford 1956

HERRMANN, H. LEBEAU, P. L.:

ATP level, cell injury and apparent epithelium-
stroma interaction in the cornea.
J. Cell Biol. 13, 465 (1962)

HERRMANN, H., and Moses, S. G.:

Content and state of glutathione in the tissues of the
eye, J. Biol. Chem. 158: 33, 1945

HEYNINGEN:

In Davson: The Eye;
Academic Press London, New York S. 381 - 469

HODSON, S. A.:

Inadquacy of aldehyde fixatives in preserving the
ultrastructure of corneal endothelium in rabbit and
monkey.
Expl. Eye Res. 7 221-224 1968.

HOHORST, H. J.:

Der Reduktionszustand des Diphospho-pyridin-
Nukleotidsystems im lebenden Gewebe. Eine
Studie über Metabolitgleichgewichte in der Ratten-
Leberzelle.
Ubazg, Dissert. Marburg 1960.

HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ und Th. BOCHER:

Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen
in der Leber der Ratte.

Biochem. Z. 332, 118 (1959)

HOHORST, H. J., M. REIM and H. BARTELS:

Studies on the creatine kinase equilibrium
in muscle and the significance of ATP and
ADP levels.

Biochem. biophys. Res. 7, 142 (1962)

JACOB, H. S., and JANDL, J. H.:

Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. III.
Glutathione in the regulation of the hexose
monophosphate pathway, J. Biol. Chem. 241: 4243, 1966.

JAKUS, M. A.:

The fine structure of the human cornea.
In: The structure of the eye, ed. G. K.
Smelser, S. 343

Academic Press; London-New York 1961

KARLSON, P.:

Kurzes Lehrbuch der Biochemie.

Georg Thieme Verlag; Stuttgart 1967

KINOSHITA, J. H.:

Annual review. Selected topics in ophthalmic biochemistry,
Arch. Ophthal. 72: 554, 1964

KINOSHITA, J. H.:

Physiological Chemistry of the Eye.

Archs. Ophthal. NY 68:554

KINOSHITA, J. A. und T, MASURAT:

Aerobic pathway of glucose metabolism in bovine corneal epithelium.

Amer. J. Ophthal. 48, II, 47 1959.

KINOSHITA, S. H., and MASURAT, T.:

The direct oxidative carbohydrate cycle of bovine corneal epithelium, Arch. Biochem. 53: 9, 2 54.

KLINGENBERG:

In Bergmeyer Methoden der enzymatischen Analyse Band II
Verlag CChemie S, 1975-2004

KOMOTO, M.:

Experimental studies on hoxose monophosphate pathway of cornea.

Acta Soc. opthal. jap. 69, 771-776 (1965)
mit engl. Zusammenfass. (Japanisch)

LUTHE:

Inaugural-Dissertation Marburg 1972

MAURICE, D.M.:

The cornea and sclera.

In: The Eye, 2. Aufl. Bd. I.

Edit. H. Davson, Academ. Press New York,
London, 1969. S. 489-600

MEROLA, L. O., KERN, H. L. and KINOSHITA:

The effect of calcium on the cations of calf lens.

MISHIMA, S., KUDO, T.:

In vitro incubation of rabbit cornea.

Invest. Ophthal. 6, 329-339 (1967).

OGUCHI, HIDA und SHIMITSU:

Distribution of glutathion in the eyebale.

Nippon Ganka Gakkei Zasshi 66 (12), 1488-92 (1962).

PEDLER, C.:

The fine structure of the corneal epithelium.

Exp. Ey. Res. 1, 286 (1962)

PIRIE, A.: G

Glutathione peroxidase in lens and a source of hydrogen peroxide in aqueous humour,

Biochem. J. 96: 244, 1965.

PIERI, A. and R. VAN HEYNINGEN:

Biochemistry of the eye.

Blackwell Sci. Publ.; Oxford 1966.

REIM, M.:

Untersuchungen über Enzymaktivitäten und Metabolitgehalte des energieliefernden Stoffwechsels in der Hornhaut.

Habilitationsschrift Marburg 1966.

REIM, M.:

Änderungen des Phosphorylierungsstatus des Adenylsäuresystems in der Tränendrüse bei Ischämie und seine Beziehungen zum Redox-potential des cytoplasmatischen Diphosphopyridinnucleotids.

A. V. Graefes Arch. Ophthal. 167, 559 (1964).

REIM, M., CATTEPOEL, H., BITTMANN, K. und KILP, H.:

Methodische und physiologische Aspekte bei der statistischen Auswertung von Metabolitspiegeln in verschiedenen Kompartimenten der vorderen Augenabschnitte.

Albrecht v. Graefes Arch. klin. Exp. Ophthal. 177, 355-368

REIM, M., FOERSTER, K. H. and CATTEPOEL, H.:

Some criteria of the metabolism in the donor cornea.

Ophthalmology Proc. 21th int. Congr. Mexico. D. F. 8-14
March 1970, 728-733

Excerpta Medica Amsterdam 1971

REIM, M. und MEYER, D.:

Über Veränderungen von Metabolitgehalten im
Corneaeepithel in Anaerobiose. A. v. Graefes
Arch. Ophthal. 174, 103-109, 1967.

REIM, M., MEYER, D. und CATTEPOEL, H.:

Über die Bedeutung des Frierstopverfahrens für den
in-vivo-Status der Metabolite im Cornealepithel.
A. V. Graefes Arch. Ophthal. 174, 97-102 (1967).

ROHEN, J. W.:

Das Auge und seine Hilfsorgane
Handbuch über die mikroskopische Anatomie der
Muskulatur Bd. III/4
Springer: Berlin/Göttingen/Heidelberg
New York 1964.

SALITERNIK-GIVANT, E. R., BERMAN, E. R.:

Bioch. heterogeneity of the corneal Glycosaminoglycans.
Ophthal. Res. 1, 94-108 (1970).

SCHMIDT, F.:

Der Metabolitgehalt von Epithel und Stroma der Kaninchen-
cornea und seine Veränderung unter verschiedenen experimen-
tellen Bedingungen.

Inaugural Diss. Marburg 1967.

SÖLLNER, F. und HOCKWIN, O.:

Ober den Gehalt frischer und konservierter
Hornhäute an säurelöslichen Phosphatverbindungen (Nucleotide).

A. v. Graefes Arch. Ophthal. 167, 150-157 (1964).

SÖLLNER, F., HOCKWIN, O., NOLL, E. und LIGHT, W.:

Ober das Verhalten der Aktivitäten einiger
Fermente in Hornhäuten in Abhängigkeit von
Konservierungsart und Konservierungsdauer.

A. V. Graefes Arch. Ophthal. 170, 19 (1966).

STRAUB, W. und REIM, M.:

Die Anwendung von Kälte in der Ophthalmologie.
Marburger Universitätsbund, Jahrbuch 1966/67.

TENG, G. C.:

The fine structure of the corneal epithelium
and basement membrane of the rabbit.

Amer. J. Ophthal. 51, 278 (1961).

VIRCHOW, H.:

Mikroskopische Anatomie der äußeren Augenhaut und
des Lidapparates.

In: Handbuch der gesamten Augenheilkunde,
2. Auflage, Bd. I, hrsg. v. Th. Saemisch
W. Engelmann; Leipzig 1910.

Tabellen zu den Ergebnissen

Warme Abrasio

Frierstopmethode

Bezeichnung GSH/GSSG

Bezeichnung GSH/GSSG

1a	20,8
1b	----
2a	49,5
2b	----
3a	31,5
3b	40,4
4a	60,6
4b	51,0
5a	----
5b	30,9
6a	33,3
6b	33,7
7a	----
7b	----
8a	15,3
8b	30,1
11	29,3
12	22,8
13	66,2
14	52,7
15	53,7
16	40,4

1a	6,30
1b	10,46
2a	8,93
2b	12,13
3a	9,91
3b	8,97
4a	15,18
4b	14,59
5a	3,69
5b	----
6a	15,47
6b	20,59
7a	12,43
7b	6,32
8a	12,90
8b	8,85
9a	5,56
9b	----
10a	----
10b	----
11a	2,80
11b	7,86
12a	6,99

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

Tabellen zu den Ergebnissen

GSH/GSSG Messungen bei warmer Abrasio

Bezeichnung	GSH	GSSG	Summe GSH + 2 GSSG
1a	3490	167	3824
1b	-----	---	-----
2a	8910	180	9270
2b	10500	---	-----
3a	7130	226	7682
3b	6910	148	7206
4a	6850	113	7076
4b	7320	143	7606
5a	6850	---	-----
5b	8050	260	8570
6a	8960	270	9500
6b	5940	176	6292
7a	5490	---	-----
7b	5060	---	-----
8a	4410	287	4974
8b	4010	133	4276
11	5110	174	5458
12	5810	253	6316
13	6490	98	6786
14	6800	129	7058
15	6130	114	6358
16	6870	170	7040

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

Tabellen zu den Ergebnissen

GSH/GSSG Messungen bei Frierstopmethode

Bezeichnung	GSH	GSSG	Summe GSH + 2 GSSG
1a	2780	441	3662
1b	2700	258	3216
2a	3700	414	4528
2b	3580	295	4170
3a	2370	239	2848
3b	2870	431	3732
4a	2520	166	2752
4b	2730	187	3104
5a	2120	576	3272
5b	-----	252	-----
6a	3900	252	4404
6b	4860	236	5332
7a	3010	242	3494
7b	2720	430	3580
8a	5370	416	6202
8b	3860	436	4732
9a	2220	399	3018
9b	1710	---	-----
10a	-----	572	-----
10b	-----	---	-----
11a	1520	541	2602
11b	4570	581	5732
12a	3580	348	4276

 Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

Tabellen zu den Ergebnissen

Frierstopmethode

Bezeichnung	ATP	ADP	ATP/ADP
S8 P2	3180	293	10,8
S8 P1	3460	388	8,91
S9 P1	3290	318	10,4
S9 P2	3440	353	9,74
S9 P3	3920	284	10,3
S9 P4	2570	246	10,2
S7 P2	1810	130	13,9
S7 P3	2400	240	10,0

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

Tabellen zu den Ergebnissen

Warme Abrasio ATP, ADP, ATP/ADP

Bezeichnung	ATP	ADP	ATP/ADP
11	1590	1800	0,883
12	867	1620	0,535
13	1000	2640	0,378
14	750	2220	0,337
15	854	1590	0,537

Warme Abrasio

Frierstopmethode

Bezeichnung	G-6-P	Bezeichnung	G-6-P
11	588	S8 P2	117
12	787	S8 P1	131
13	689	S9 P1	126
14	371	S9 P2	116
15	660	S9 P3	78
		S9 P4	80

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

Tabellen zu den Ergebnissen

Frierstopmethode ——— TPN Messungen

Laufende Nr.	Probe Bez.	TPN
1	S7 P1 A	141
2	S7 P1 B	130
3	S7 P2	140
4	S7 P3	128
5	S7 P4 A	234
6	S7 P4 B	178
7	S7 P5 A	161
8	S7 P5 B	161
9	S5 P1 A	160
10	S5 P1 B	220
11	S6 P1 A	150
12	S6 P1 B	170
13	S6 P2	120
14	S5 P4 A	115
15	S5 P4 B	187
16	S5 P3 A	240
17	S5 P3 B	290
18	S4 P2	190
19	S5 P2 A	168
20	S5 P2 B	121
21	S6 P4 A	106
22	S6 P4 B	117

Werte in 10^{-9} Mol/g Frischgewicht

Tabellen zu den Ergebnissen

Frierstop TPNH

Direkte Messung

Bezeichnung	TPNH
1	190
2	344
3	258
4	298
5	248
6	357
7	232
8	190
9	290
10	305
11	220
12	250
13	110
14	118
15	124

Indirekte Messung

Bezeichnung	TPNH
18	149
19	218
20	268
21	260
22	172
23	172
24	188
25	139

Bezeichnung DPNH

1	43
2	41
3	70
4	61
5	107
6	92
7	48
8	55

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
Gl - I	Glyoxalase I
GLDH	Glutamat - Dehydrogenase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxydiert
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
HK	Hexokinase
LDH	Lactat Dehydrogenase
NAD ⁺	Nicotinamid - adenin - dinucleotid (ox.)
NADH	Nicotinamid - adenin - dinucleotid (red.)
NADP ⁺	Nicotinamid - adenin - dinucleotidphosphat (ox.)
NADPH	Nicotinamid - adenin - dinucleotidphosphat (red.)
PEP	Phosphoenol - pyruvat
PK	Pyruvatkinase
TRAP	Triäthanolaminpuffer

Lebenslauf

Am 31. Mai 1947 wurde ich als zweites Kind des Oberamtsrats Friedrich Beermann und seiner Ehefrau Lotte geb. Teichmann in Bielefeld geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit 1954 bis 1958 besuchte ich das Helmholtz-Gymnasium in Bielefeld, wo ich am 7. 7. 1967 das mathematisch naturwissenschaftliche Abitur machte. Im WS 1968/69 studierte ich in Saarbrücken Biologie und wechselte dann 1969 zum SS in die medizinische Fakultät nach Marburg. Hier bestand ich am 9. 10. 1969 meine naturwissenschaftliche Vorprüfung. Am 23. 9. 1970 bestand ich das Physikum. Nach 6 Semestern klinischen Studiums und Famulaturen im St. Franziskus Hospital in Bielefeld und der Augenklinik in Marburg bestand ich am 14. Dezember 1973 das Staatsexamen.

Seit dem 2. 4. 1971 bin ich mit der Studentin Barbara Beermann geb. Flügge verheiratet. Wir haben zwei Töchter.

Herrn Prof. Dr. med. M. Reim danke ich für die Themenstellung, seine Anleitung und freundliche Hilfe, mit der er mich bei allen Problemen unterstützte.

Frau Helga Cattepoel danke ich für ihre Mitarbeit.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in Saarbrücken

Gräser, de Latin, Fragstein, Seel, Wulf;

in Marburg

Amon, Berendes, Bommer, Brasch, Buchholz, Dölle, Engelhard
Exner, Friedrich, Gans, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Hensel, Heuser, Hildebrant, Hort, Ihm, Jacob, Karlson, Klaus, Koransky, Korb, Linneweh, Mann, Martini, Nesswetha, Oehmig
Petry, Pots, Reim, Remschmidt, Rodeck, Rohen, Schleyer,
Schmitz - Moormann, Siegert, Wendt.

